

配对相关的同源异型框 1 导入棕色脂肪干细胞构建生物起搏

尹琳 刘明鑫 王凤媛 唐艳红 王晞 赵庆彦 王腾 陈玉婷 黄从新

【摘要】 目的:探讨过表达配对相关的同源异型框 1(Prrx1)是否能诱导棕色脂肪干细胞(BADSC)向类窦房结细胞分化,构建生物起搏。 方法:分离培养大鼠 BADSC,分别转染带有 GFP 的空载腺病毒(Ad-GFP 组)和带有 Prrx1 的腺病毒(Ad-Prrx1 组)。光镜下观察细胞形态和荧光表达强度,Western blot、实时聚合酶链反应检测窦房结细胞相关的起搏蛋白(HCN4)和转录因子[TBX18、胰岛素基因增强子结合蛋白 1(ISL-1)、Pitx2]的表达水平,膜片钳技术检测起搏电流 I_f ,免疫荧光技术检测细胞 HCN4、TBX18 和 ISL-1 的表达。 结果:Ad-Prrx1 组的起搏相关因子 TBX18、ISL-1、HCN4 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于 Ad-GFP 组,而 Pitx2 的 mRNA 表达水平明显降低(P 均 <0.05)。膜片钳记录到 BADSC 的 I_f 电流,且该电流能被 4 mmol/L CsCl 阻断。免疫荧光显微镜下可见 Ad-Prrx1 组 Prrx1 与 TBX18、ISL-1、HCN4 在 BADSC 中共表达,而 Ad-GFP 组未发现上述起搏相关蛋白共表达。 结论:过表达 Prrx1 能诱导 BADSC 分化为类窦房结细胞。

【关键词】 配对相关的同源异型框 1;生物起搏;类窦房结细胞;TBX18;胰岛素基因增强子结合蛋白 1

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.06.008

Paired-related homeobox 1 introduced into brown adipose-derived stem cells to trigger biological pacing
YIN Lin, LIU Mingxin, WANG Fengyuan, TANG Yanhong, WANG Xi, ZHAO Qingyan, WANG Teng, CHEN Yuting, HUANG Congxin Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University; Cardiovascular Research Institute, Wuhan University; Hubei Key Laboratory of Cardiology, Hubei 430060, China

【Abstract】 Objective: To investigate whether overexpression of paired-related homeobox 1 (Prrx1) can successfully induce differentiation of brown adipose-derived stem cells (BADSCs) into sinus node-like cells. **Methods:** BADSCs were isolated and cultured, and the adenovirus with GFP (Ad-GFP group) and Prrx1 (Ad-Prrx1 group) were transfected respectively. Light microscope was used to observe cell morphology and fluorescence expression intensity. Western blot and real-time polymerase chain reaction were used to detect the expression level of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4 (HCN4) and transcription factors related to sinus node cells (Tbx18, Isl-1 and Pitx2). Whole-cell patch-clamp technique was used to record the pacing current hyperpolarization-activated inward current (I_f). Immunofluorescence technique was used to detect the expression of HCN4, Tbx18 and Isl-1. **Results:** The mRNA and protein expression levels of Tbx18, Isl-1 and HCN4 in Ad-Prrx1 group were significantly higher than those in Ad-GFP group, while the mRNA expression level of Pitx2 was significantly lower (P all <0.05). Whole-cell patch clamps were able to record the I_f current in Ad-Prrx1

group rather than in Ad-GFP group. The I_f current could be blocked by 4 mmol/L CsCl. Immunofluorescence analysis showed that Prrx1 was coexpressed with TBX18, ISL-1, and HCN4 in Ad-Prrx1 group, which did not appear in Ad-GFP group. **Conclusions:** Overexpression of prrx1 can induce BADSCs to differentiate into sinus node-like cells.

【Key words】 Paired related homeobox 1; Biological pacing; Sinus node-like cells; TBX18; ISL-1

生物起搏是通过诱导类窦房结样细胞的产生,构建类似于窦房结的起搏位点以替代原受损的起搏细胞,使病态窦房结综合征患者获得正常生理活动所需的起搏心率。在心血管胚胎发育期间,心脏搏动位点首先位于左侧,后逐渐转移至右侧,左侧的搏动位点消失,Nodal-Pitx2 信号通路在心脏左侧的偏侧性表达过程中发挥了不可替代的作用^[1]。研究证明,在斑马鱼的胚胎发育期,配对相关的同源异型框(prrx)1 在心脏右侧循环发育过程中发挥重要作用,其在右侧静脉窦角的表达明显高于左侧,Prrx1 敲除后右侧静脉窦发育不全,心房体积小,但动脉极未受明显影响,并且 Prrx1 在心脏后极与胰岛素基因增强子结合蛋白 1(ISL-1)共表达,Prrx1 敲除后无法检测到胚胎窦房结重要标志物 TBX18 和 ISL-1 的表达^[2]。本研究旨在探讨 Prrx1 与窦房结发育相关转录因子的关系,阐述 Prrx1 在生物起搏中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

2 只 40~50 g SPF 级别雄性 SD 大鼠由湖北省疾病预防控制中心提供,动物许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)、I 型胶原酶、胰蛋白酶消化液购自美国 Sigma 公司;携带 Prrx1 和 GFP 基因的腺病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司;抗大鼠 HCN4 抗体、抗大鼠 TBX18 抗体和抗大鼠 ISL-1 抗体购自美国 abcam 公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒购自日本 Takara 公司。实时聚合酶链反应(qRT-PCR)仪购自美国 Life Technologies 公司,倒置荧光显微镜、膜片钳系统购自美国 MD 公司。

1.2 大鼠棕色脂肪干细胞(BADSC)的原代培养及鉴定

将 SD 大鼠脱颈处死,75%乙醇浸泡 10 min,无菌条件下取大鼠肩胛间区皮下脂肪组织置于培养皿中,PBS 清洗后剪碎,加入 I 型胶原酶,37 °C 振荡消化 60 min,1 500 r/min 离心 10 min,除去上层脂肪及上清,收集所得的细胞沉淀物,加入含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,37 °C、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。

培养 48 h 后换液,PBS 冲洗后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液。以后每 48 h 换液 1 次,细胞融合至 80% 时传代,传至第 3 代备用。

在显微镜下观察原代及传代细胞形态变化。取第 3 代细胞,常规胰酶消化成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,加入 CD90、CD45 单克隆抗体,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞表面抗原阳性率。

1.3 Prrx1-GFP 腺病毒的构建和转染

采用 AdMax 腺病毒包装系统进行腺病毒包装,将携带 Prrx1 的腺病毒穿梭质粒与不携带腺病毒大部分基因组(E1/E3 缺失)的辅助包装质粒共转染 HEK293 细胞,酶切产生携带 Prrx1 的非复制型重组腺病毒,PCR 扩增 Prrx1 ORF 序列,将处理好的目的片段与载体连接,得到重组腺病毒质粒 pH-BAd-MCMV-GFP-Prrx1。

将 BADSC 种于 24 孔板内,调整细胞计数后根据感染复数(MOI)值 0、10、20、50、100、200 分别加入带有 GFP 和带有 Prrx1 基因的腺病毒,以不引起明显细胞病变的最大 MOI 值作为最适宜 MOI。将 BADSC 接种于 6 孔板,随机分为 Ad-GFP 组和 Ad-Prrx1 组。Ad-Prrx1 组转染 Prrx1 腺病毒(Ad-Prrx1-GFP),Ad-GFP 组转染 Ad-GFP 作为对照。荧光显微镜下观察并拍照记录培养 24 h、48 h 后的细胞形态。

1.4 免疫荧光检测

细胞转染病毒 7 d 后,4% 多聚甲醛冰上固定 10~15 min,分别加入 HCN4、TBX18 或 ISL-1 一抗 4 °C 孵育过夜,荧光二抗室温孵育 1 h,采用 DAPI 染核 10 min 后,置于倒置荧光显微镜下观察。

1.5 qRT-PCR 检测

采用 qRT-PCR 检测病毒转染 7 d 后细胞 TBX18、ISL-1、Pitx2 及 HCN4 mRNA 的表达水平, β -Actin 为内参。采用 Trizol 试剂提取总 RNA,分光光度计测定 RNA 的浓度。cDNA 的合成体系:5 × Reaction Buffer 2.0 μ L, dNTP Mixture 2.0 μ L, Oligo dT 1.0 μ L, RNase Inhibitor 1.0 μ L, 总 RNA 13 μ L (2 μ g), 逆转录酶 0.5 μ L; 37 °C 60 min, 95 °C 3 min。使用 SYBR Green I PCR 试

剂盒进行 PCR,引物见表 1。每个样品均作 3 个复孔,反应条件:95 ℃预变性 1 min,95 ℃变性 15 s,58 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 45 s,共 40 个循环,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因 mRNA 的相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物信息

基因	基因编号	引物	碱基大小/bp
R-β-actin	NM_031144. 3	上游引物 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3' 下游引物 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3'	110
H-Prrx1	NM_006902. 4	上游引物 5'-TTTGTGCGAGAAGACCTTGC-3' 下游引物 5'-AGTAGGATTTGAGGAGGGAAGC-3'	142
R-ISL-1	NM_017339. 3	上游引物 5'-TGCGAGTGTAATCAGTATTTGG-3' 下游引物 5'-GTCGTTCTTGCTGAAGCCTATG-3'	136
R-TBX18	NM_001108173. 1	上游引物 5'-GGAGACTTGGATGAGACAAGTGAT-3' 下游引物 5'-TTGGCAAATGGATTCTGTCT-3'	282
R-HCN4	NM_021658. 1	上游引物 5'-CACTAAGGGCAACAAGGAGACC-3' 下游引物 5'-GGTAGTTGAAGACGCCTGAGTTG-3'	281
R-Pitx2	NM_001042505. 1	上游引物 5'-AGAAACCGCTACCCAGACATG-3' 下游引物 5'-TACGAGTAGCCGGGTACATG-3'	212

1. 6 Western blot 检测

病毒转染 7 d 后,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳后转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h。β-actin(1 : 10 000)、ISL-1(1 : 500)、TBX18(1 : 500)、HCN4(1 : 1 000)一抗 4 ℃孵育过夜,羊抗大鼠 HRP(1 : 10 000)二抗孵育 30 min,化学发光法显影。各条带扫描后采用图像分析系统分析平均灰度值,以β-Actin为内参计算蛋白的相对表达水平。

1. 7 膜片钳 I_f 电流的记录

使用 Axopatch 700B 放大器以全细胞膜模式记录起搏电流。BADSC 转染病毒 7 d 后,记录细胞 I_f 电流。细胞外液的配制(mmol/L):NaCl 138,KCl 5, CaCl₂ 2,葡萄糖 10,MgCl₂ 0. 5,HEPES 10,用 NaOH 调定 pH 值至 7. 4。电极内液的配制(mmol/L):谷氨酸钾 130,KCl 9,NaCl 8,MgCl₂ 0. 5,HEPES 10, EGTA 2,Mg-ATP 5,用 NaOH 调定 pH 值至 7. 2。I_f 电流的刺激程序:钳制电压-35 mV,再以-10 mV 为步阶从-35 mV 降至-140 mV,时程为 2 s。记录

时胞外液加入 BaCl₂ 4 mmol/L 以阻断超极化激活的内向整流钾电流(I_{kl}),予以 2 mmol/L CsCl 对记录到的 I_f 电流进行鉴定。采用 pCLAMP 6. 0. 4 软件进行数据的记录与分析处理。

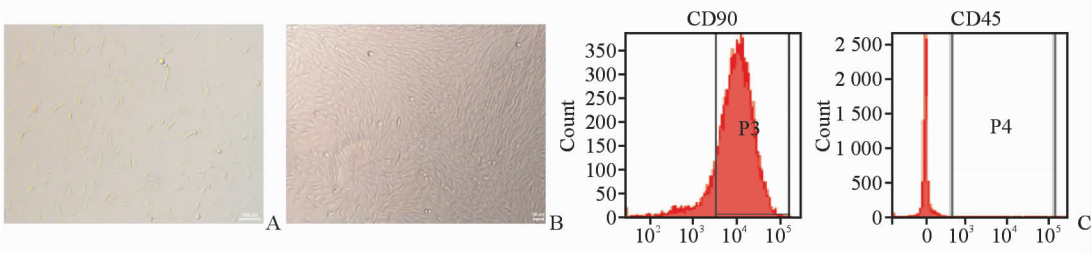
1. 8 统计学分析

通过 GrapdhPad Prism 5 统计软件进行数据分析。计量资料均用均数±标准差表示,组间比较采用两个独立样本 t 检验,以 P<0. 05 为差异有统计学意义。

2 结果

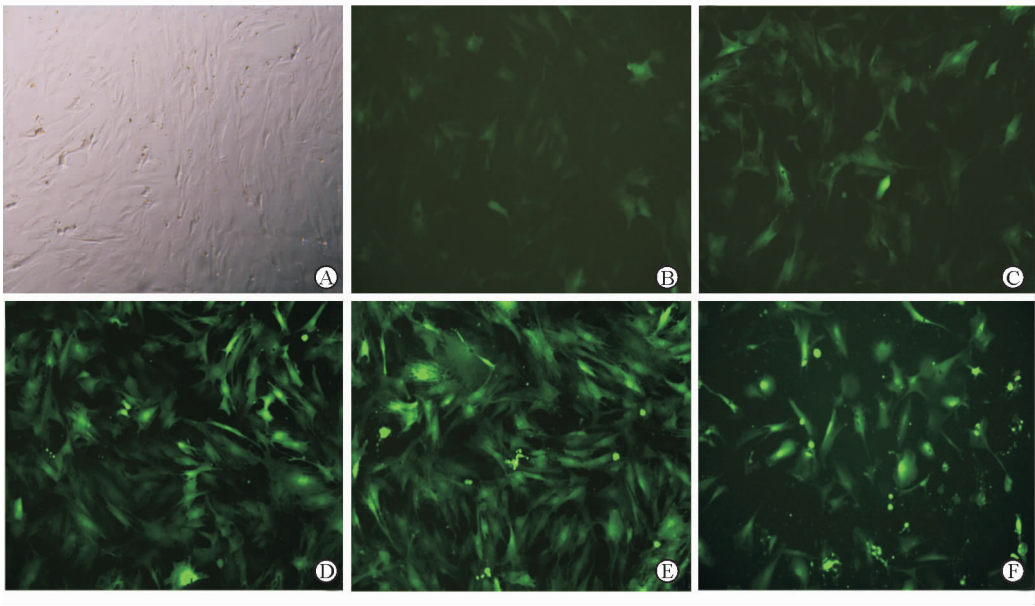
2. 1 BADSC 形态、表型鉴定及病毒转染

急性分离棕色脂肪组织,培养后 48 h 首次换液,可见散在单个的 BADSC 贴壁,呈长梭形。以后每 48 h 换液,5~7 d 后细胞形态较为均一,细胞呈旋涡样生长,可见集落形成。细胞传代至 3 代后,流式细胞仪检测示细胞 CD90 阳性率 92. 8%,CD45 阳性率<1. 2%,见图 1。腺病毒转染 BADSC,不引起明显细胞病变的病毒转染最适宜 MOI 值为 100,见图 2。转染的 GFP 和 Prrx1 均带有绿色荧光,转染 48 h 后细胞荧光表达强度增强。



注:A,B 分别为培养 48 h,7 d 的 BADSC(×100);C 为流式细胞术鉴定 BADSC

图 1 大鼠 BADSC 形态及表型鉴定



注：A、B、C、D、E、F 中感染复数(MOI)值分别为 0、10、20、50、100 和 200

图 2 BADSC 转染不同浓度病毒时荧光强度的变化(×100)

2.2 过表达 Prrx1 能增加窦房结相关因子的表达

腺病毒转染 7 d 后检测两组细胞 TBX18、ISL-1、HCN4 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 Prrx1、Pitx2 的 mRNA 表达水平。与 Ad-GFP 组相比,Ad-Prrx1 组中的 Prrx1、TBX18、ISL-1 和

HCN4 的 mRNA 表达水平明显升高,而 Pitx2 的表达水平明显降低(P 均 ≤ 0.05)。与 Ad-GFP 组相比,Ad-Prrx1 组中的 TBX18、ISL-1 和 HCN4 的蛋白表达水平明显升高(P 均 ≤ 0.05)。见表 2、图 3。

表 2 两组窦房结相关因子 mRNA 和蛋白相对表达水平的比较

	mRNA 表达水平		蛋白质表达水平	
	Ad-GFP 组	Ad-Prrx1 组	Ad-GFP 组	Ad-Prrx1 组
Prrx1	1.00 ± 0.00	1585.00 ± 154.00 ⁽¹⁾	—	—
ISL-1	1.00 ± 0.00	1.67 ± 0.30 ⁽¹⁾	0.05 ± 0.02	0.13 ± 0.04 ⁽¹⁾
TBX18	1.00 ± 0.00	1.49 ± 0.34 ⁽¹⁾	0.10 ± 0.03	0.44 ± 0.06 ⁽¹⁾
HCN4	1.00 ± 0.00	2.14 ± 0.51 ⁽¹⁾	0.10 ± 0.04	0.28 ± 0.06 ⁽¹⁾
Pitx2	1.00 ± 0.00	0.71 ± 0.13 ⁽¹⁾	—	—

注：与 Ad-GFP 组相比，⁽¹⁾ $P < 0.05$

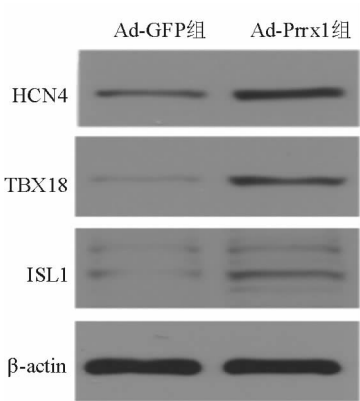


图 3 两组 TBX18、ISL-1 及 HCN4 的蛋白表达水平

2.3 Prrx1 与 TBX18、ISL-1 共表达

免疫荧光检测发现,腺病毒转染 7 d 后 Ad-Prrx1 组可见 HCN4、TBX18、ISL-1 与 Prrx1 在 BADSC 中共表达,Ad-GFP 组未发现上述蛋白共表达。见图 4。

2.4 过表达 Prrx1 能诱导 BADSC 产生起搏电流

在倒置荧光显微镜下筛选出胞膜较为光滑且同时表达绿色荧光的长梭状细胞,进行起搏电流检测,见图 5A。腺病毒转染 7 d 后膜片钳可在 Ad-Prrx1 组中记录到 I_f 电流,当在细胞外液中加入 4 mmol/L 的 CsCl 后,该电流被阻断,洗脱阻断剂

CsCl 后,内向电流可恢复,且该内向电流呈现电压依赖性,随着电压的减小而逐渐减小;而在 Ad-GFP 组中未记录到该超极化激活的内向电流,见图 5B、5C。

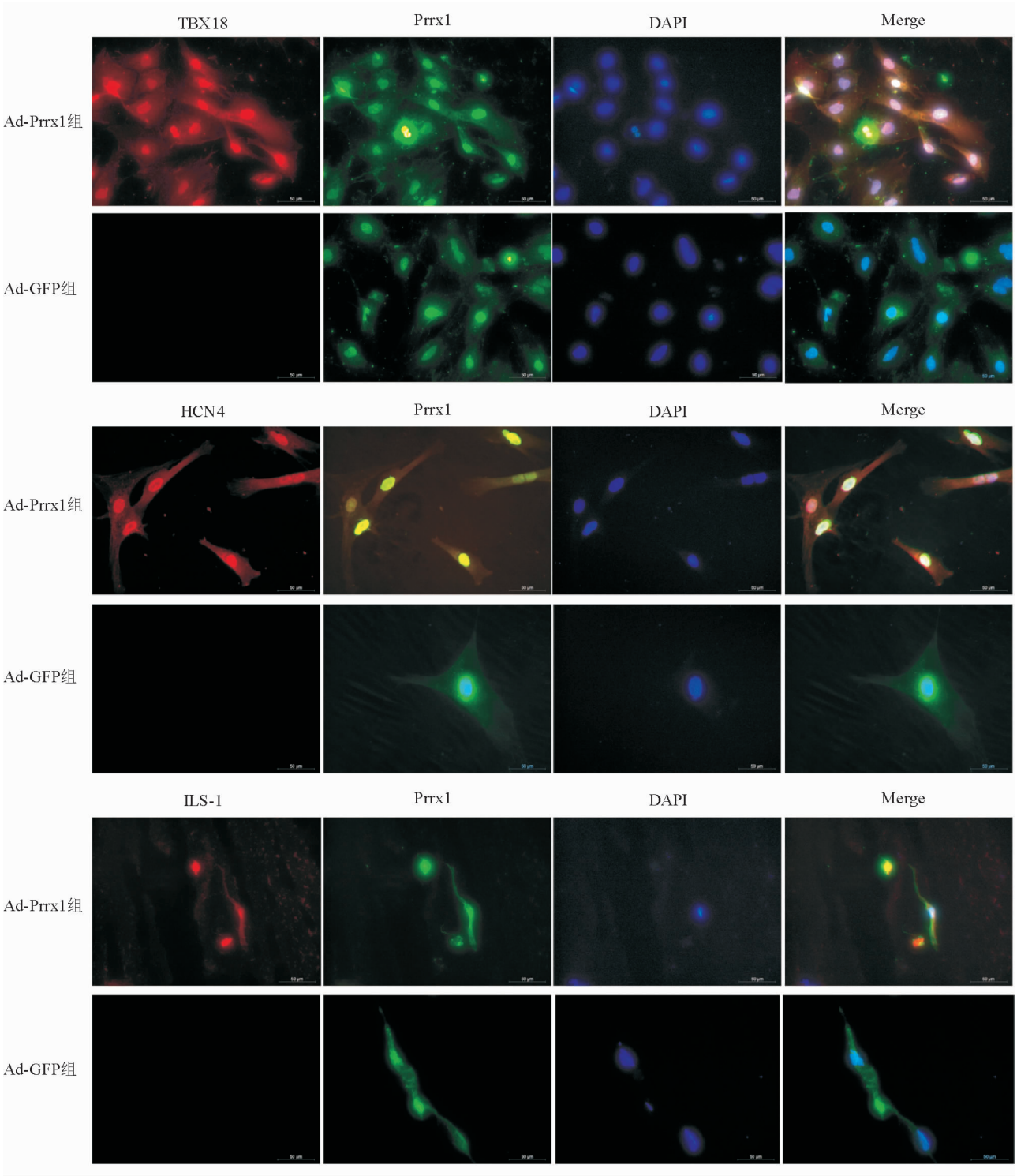
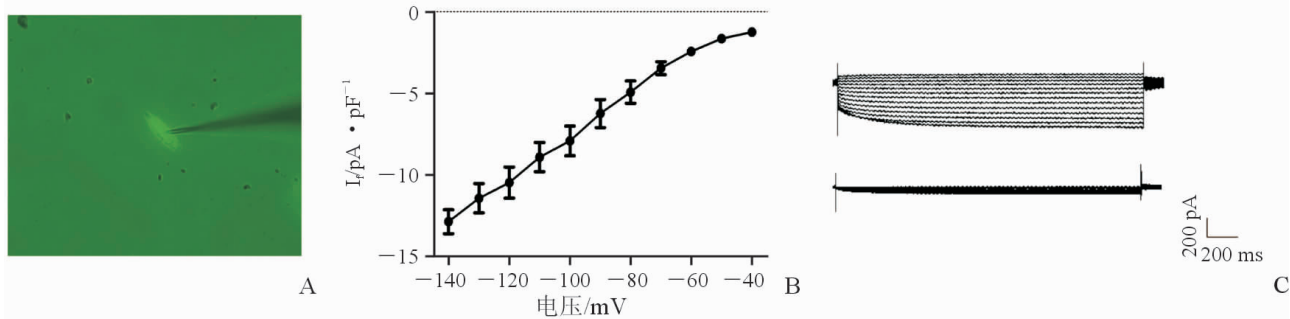


图 4 两组 Prrx1 与 TBX18、ISL-1 及 HCN4 的共表达情况

3 讨论

近年来构建窦房结起搏样细胞的方式大致可分为 4 种:(1)以基因导入为基础,如通过导入各种编码离子通道的基因,抑制 KCNJ2 基因[编码内向

整流钾离子通道(I_{K1})]^[3]或超极化激活环核苷酸门控通道(HCN,编码 I_f 电流)^[4]。(2)通过干细胞移植诱导人类胚胎干细胞向窦房结样细胞分化^[5]。(3)融合细胞-基因的方法,如将 T-box 家族中转录



注: A 为倒置荧光镜下转染腺病毒后用于膜片钳记录的 BADSC($\times 200$); B 为起搏电流 I_f 的电压-电流曲线($n=8$); C 上图为 Prrx1 组所记录到的内向电流, 下图为 CsCl 阻断后的电流

图 5 BADSC 起搏电流 I_f 的记录

因子 TBX18 导入多能干细胞(iPSC)中,诱导出类窦房结细胞^[6]。(4)体细胞重编程,如直接构建带有 TBX18 的病毒,将其注入成年猪的心肌细胞^[7],诱导形态和功能与结样细胞相似的细胞。

生物起搏器的研发可以借鉴窦房结的胚胎发育过程。TBX18 和 ISL-1 作为窦房结早期发育的标志蛋白,在窦房结的胚胎发育期间高表达。研究表明, TBX18 和 ISL-1 单独作用于心肌细胞或者干细胞能诱导出类窦房结细胞,从而构建生物起搏^[8-9]。现已发现的参与窦房结胚胎期发育的因子主要包括: TBX18、TBX3^[10]、shox2^[11-12]、ISL-1^[13]、Nkx2. 5^[14] 等转录因子, HCN4^[15]、L 型钙通道、钠钙交换体等离子通道,细胞表面黏附分子 CD166^[16],缝隙连接蛋白 Cx45、Cx43 等。

Prrx1 与 shox2 为同源基因,两者在胚胎期骨骼和心血管的发育中起重要作用。Bergwerff 等^[17]研究发现 Prrx1 存在于间质,参与细胞基质的分化,在胚胎中表达于中胚层和神经嵴,敲除 Prrx1 可导致动脉导管错位、主动脉弓不能正常弯曲、右侧锁骨下动脉向后异常倾斜等血管异常。此外, Prrx1 还可促进血管平滑肌细胞扩增,与 Prrx2 一起调控肺血管病^[18]。在成人中, Prrx1 突变可引起心房颤动, Prrx1 突变还可影响心脏的动作电位时程,从而增加房颤的易感性^[19-20]。

Ocana 等^[2]研究发现 Prrx1 在胚胎期与 TBX18、ISL-1 共表达,敲除 Prrx1 可导致静脉窦区几乎不表达 TBX18、ISL-1。但 Prrx1 在窦房结发育过程中的作用尚未明确,本研究发现通过过表达 Prrx1 能增加 BADSC 窦房结相关因子 TBX18、ISL-1 和 HCN4 的表达,且能在该细胞上记录到起搏 I_f 电流,提示过表达 Prrx1 能诱导出类窦房结细胞。因此,我们推测 Prrx1 可能作为上游调节因子,调节 TBX18 和 ISL-1

的表达,在生物起搏中发挥作用。此外,过表达 Prrx1 还能抑制 Pitx2 的转录水平,提示其可能通过抑制 Pitx2 在心脏右侧表达,从而避免 Pitx2 对右侧起搏位点的抑制作用,此结果与 Ocana 等的研究结果一致,但 Prrx1 与 Pitx2 的相互作用仍值得进一步探究。

本研究有一定的局限性,仅发现 Prrx1 能影响细胞窦房结相关因子的表达,未研究其对心率的影响;仅以 BADSC 为研究对象, Prrx1 对心肌细胞及 iPSC 的功能影响未能阐明。未来尚需在动物实验中进行进一步验证 Prrx1 诱导类窦房结细胞的作用。

参 考 文 献

- [1] Wang J, Bai Y, Li N, et al. Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(25): 9181-9186.
- [2] Ocana OH, Coskun H, Minguillón C, et al. A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates[J]. Nature, 2017, 549(7670): 86-90.
- [3] Miake J, Marban E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer[J]. Nature, 2002, 419(6903): 132-133.
- [4] Qu JH, Plotnikov AN, Danilo P, et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart[J]. Circulation, 2003, 107(8): 1106-1109.
- [5] Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(10): 1282-1289.
- [6] Gorabi AM, Hajighasemi S, Khorram V, et al. Functional biological pacemaker generation by T-Box18 protein expression via stem cell and viral delivery approaches in a murine model of complete heart block[J]. Pharmacol Res, 2019, 141: 443-450.
- [7] Kapoor N, Liang W, Marban E, et al. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(1): 54-62.
- [8] Li Y, Yang M, Zhang G, et al. Transcription factor TBX18 promotes adult rat bone mesenchymal stem cell differentiation to biological pacemaker cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(2): 845-851.

- [9] Zhang J, Yang M, Yang AK, et al. Insulin gene enhancer binding protein 1 induces adipose tissue-derived stem cells to differentiate into pacemaker-like cells[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(2):879-889.
- [10] Choudhury M, Black N, Alghamdi A, et al. TBX18 overexpression enhances pacemaker function in a rat subsidiary atrial pacemaker model of sick sinus syndrome[J]. J Physiol, 2018, 596(24):6141-6155.
- [11] Feng Y, Yang P, Luo S, et al. Shox2 influences mesenchymal stem cell fate in a co-culture model in vitro[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1):637-642.
- [12] Ionta V, Liang W, Kim E H, et al. SHOX2 overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability[J]. Stem Cell Reports, 2015, 4(1):129-142.
- [13] 张健, 杨安康, 杨媚, 等. ISL-1 和 Tbx18 联合转染对乳鼠心室肌细胞重编程的作用研究[J]. 国际心血管病杂志, 2018, 45(6):351-357.
- [14] 杨安康, 湛晶晶, 黄从新. Nkx2-5 与窦房结发育及相关转录调控因子[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2018, 32(6):585-588.
- [15] Kozasa Y, Nakashima N, Ito M, et al. HCN4 pacemaker channels attenuate the parasympathetic response and stabilize the spontaneous firing of the sinoatrial node[J]. J Physiol, 2018, 596(5):809-825.
- [16] Scavone A, Capilupo D, Mazzocchi N, et al. Embryonic stem cell-derived CD166+ precursors develop into fully functional sinoatrial-like cells[J]. Circ Res, 2013, 113(4):389-398.
- [17] Bergwerff M, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, et al. Patterns of paired-related homeobox genes PRX1 and PRX2 suggest involvement in matrix modulation in the developing chick vascular system[J]. Dev Dyn, 1998, 213(1):59-70.
- [18] Yoshida T, Hoofnagle MH, Owens GK. Myocardin and Prx1 contribute to angiotensin II-induced expression of smooth muscle alpha-actin[J]. Circ Res, 2004, 94(8):1075-1082.
- [19] Hsu J, Gore-Panter S, Tchou G, et al. Genetic control of left atrial gene expression yields insights into the genetic susceptibility for atrial fibrillation[J]. Circ Genom Precis Med, 2018, 11(3):e002107.
- [20] Tucker NR, Dolmatova EV, Lin H, et al. Diminished PRRX1 expression is associated with increased risk of atrial fibrillation and shortening of the cardiac action potential[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2017, 10(5):e001902.

(收稿:2019-05-13 修回:2019-09-18)

(本文编辑:胡晓静)

节能减排 低碳出行

